

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16528

研究課題名(和文)肺扁平上皮癌の増幅遺伝子SOX2とAKT経路を介した癌増殖機序解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the cancer growth mechanism mediated by the amplified gene SOX2 and the AKT pathway in lung squamous cell carcinoma and its application to treatment

研究代表者

飯島 慶仁(IIJIMA, Yoshihito)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：70409184

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):SOX2陽性扁平上皮癌の腫瘍学的・分子生物学的な特徴を明確にすることは肺扁平上皮癌の治療開発において極めて重要である。治療抵抗性と臨床予後は、SOX2の発現と活動に密接に関連しており、そのような観点からSOX2によって影響を受け制御される分子ネットワークを明らかにすることは極めて重要で、SOX2とPI3K/AKT/mTOR経路との相互依存性が注目されている。本研究はSOX2がPI3K/AKT/mTOR経路を介して下流のeffectorに対する作用機序を解明し、肺扁平上皮癌に対する分子標的治療の基礎的な検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の分子生物学的進歩により、癌の発生や進展機構が急速に解明されつつある。とりわけ、ゲノム解析をはじめとする網羅的分子解析技術の進歩は目覚ましく、これらの機構解明に留まらず、新しい治療標的分子の発見から癌分子標的治療薬の開発が加速している。肺癌でも、特に腺癌でEGFR遺伝子変異やALK融合遺伝子に対する分子標的治療薬の進歩が顕著である。一方で扁平上皮癌においては、現在まで治療標的となるドライバー遺伝子変異は確認されておらず、実用化された分子標的治療薬はない。癌遺伝子の活性化を導く遺伝子増幅の標的を同定し、癌発生の分子機構の解明に寄与する。

研究成果の概要(英文):Clarification of the oncological and molecular biological characteristics of SOX2-positive squamous cell carcinoma is extremely important for the development of new treatments for lung squamous cell carcinoma. From this point of view, it is extremely important to clarify the molecular networks affected and regulated by SOX2, and the interdependence between SOX2 and the PI3K/AKT/mTOR pathway has attracted attention. In this study, we elucidated the action mechanism of SOX2 on downstream effectors via the PI3K/AKT/mTOR pathway, and conducted a basic investigation of molecular target therapy for lung squamous cell carcinoma.

研究分野：胸部外科

キーワード：肺癌 扁平上皮癌 SOX2 PI3K/AKT/mTOR経路 分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の分子生物学的進歩により、癌の発生や進展機構が急速に解明されつつある。とりわけ、ゲノム解析をはじめとする網羅的分子解析技術の進歩は目覚ましく、これらの機構解明に留まらず、新しい治療標的分子の発見から癌分子標的治療薬の開発が加速している。肺癌でも、特に腺癌で EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子に対する分子標的治療薬の進歩が顕著である。一方で扁平上皮癌においては、SOX2 や PIK3CA などドライバー遺伝子の候補の報告は散見されるが[Bass AJ, et al. Nat Genet. 2009] [Hammerman PS, et al. Nature 2012] [Kim BR, et al. PLoS Biol. 2016], 現在まで治療標的となるドライバー遺伝子変異は確認されておらず、実用化された分子標的治療薬はない。癌遺伝子の活性化を導く遺伝子増幅の標的を同定することは、癌発生分子機構の解明に寄与し、さらに癌細胞を選択的に障害する分子標的治療薬の開発という側面からも重要である。

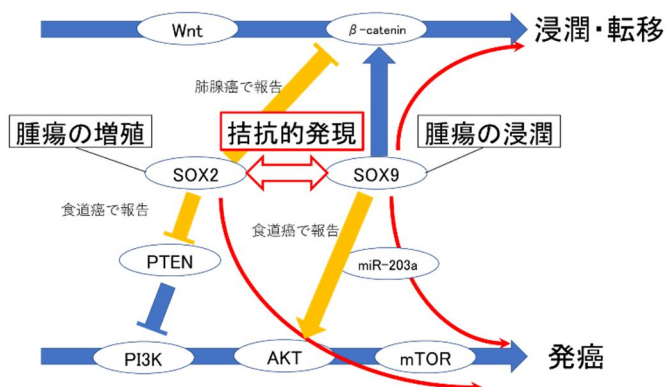
(2) 申請者は、ドライバー遺伝子の候補として SOX2, PIK3CA に注目し、各発現蛋白と肺扁平上皮癌の予後の関係を検討した。その結果、SOX2 陽性かつ PIK3CA 陰性の群が扁平上皮癌の予後予測に有用であると報告した[Iijima Y, et al. Intern J Oncol. 2015; 46: 505-12]。同時期に他のグループから、肺癌発生主要な要因であるにも関わらず、腫瘍における SOX2 蛋白質発現または遺伝子増幅は予後良好因子と、本報告と同様の結果が報告されている[Wilbertz T, et al. Mod Pathol. 2011] [Li Q, et al. Oncotarget 2016] [Velcheti V, et al. PLoS One 2013] [Yoon HI, et al. Cancer Res Treat. 2016]。

(3) さらに肺と同様に前腸内胚葉より発生する食道癌や喉頭癌において SOX2 が直接または癌抑制因子である PTEN を介して間接的に、PIK3/AKT/mTOR 経路を亢進し、腫瘍の成長や癌細胞の遊走能や浸潤能を制御すると注目されている[Gen Y, et al. Cancer Sci. 2013] [Yang N, et al. Oncol Rep. 2014]。

2. 研究の目的

(1) 上記背景から SOX2 が PIK3CA や PTEN, SOX9 と共に如何にして PIK3/AKT/mTOR 経路を制御しているかを解明することは、肺扁平上皮癌の制御に重要である(図 1)。SOX2 は正常な胚発生に不可欠であり、SOX2 がないと初期の胚致死を惹起する。また、多能性幹細胞の幹細胞性の維持を保證するコア転写ネットワーク因子の 1 つであり、肺や食道の扁平上皮形成に重要な役割を果たす[Morrissey EE, et al. Trends Cell Biol 2018]。

(2) 一方、肺扁平上皮癌における機能は明らかではない。SOX2 は癌細胞が特定の癌の起源の細胞系統とは無関係に、幹細胞様の表現型を獲得できるようにする基本的なメカニズムを誘発する。治療抵抗性と臨床予後は、SOX2 の発現と活動に密接に関連しており、SOX2 によって影響を受け制御される分子ネットワークを明らかにすることは非常に重要である。SOX2 またはその下流の effector を阻害する化合物は、様々な種類の癌の治療に有効である可能性がある。肺扁平上皮癌においては SOX2 の発現は予後良好因子とされており、SOX2 陰性肺扁平上皮癌の腫瘍学的・分子生物学的な特徴を解明することは、SOX2 陽性肺扁平上皮癌の治療開発と共に重要である。肺扁平上皮癌において SOX2 過剰発現や発現抑制がどのようなシグナル経路を介して特に PI3K/AKT/mTOR 経路を調節し発癌に作用するのかを明らかにし、SOX2 が遺伝子増幅または過剰発現している肺扁平上皮癌に対する基礎的研究を目的とする。



(図 1)

3. 研究の方法

(1) 金沢医科大学呼吸器外科で外科切除された肺扁平上皮癌症例を収集し、免疫組織学的手法を用いて SOX2, SOX9, PTEN, PIK3CA 蛋白発現の有無と臨床病理学的解析を行う。

(2) SOX2 が遺伝子増幅している肺扁平上皮癌細胞株において RNAi 法を用いて SOX2 を抑制した時に変動するシグナル経路のスクリーニングのため、リン酸化蛋白アレイ(抗体アレイ)を行う。得られた結果は、ウエスタンブロッティング法を用いて検証する。

SOX2 が遺伝子増幅し、過剰発現している肺扁平上皮癌細胞株において、RNAi 法を用いて SOX2 をノックダウンし、その時に変化するシグナル経路をリン酸化蛋白アレイを用いて、スクリーニングする。

AKT は mTOR 複合体を介して、4E-BP1, p70S6K, S6 のリン酸化を促し、細胞増殖を促進することが知られているため、リン酸化 AKT(pAKT)および mTOR 経路(リン酸化 S6(pS6))の発現が SOX2 のノックダウンにより減弱するか確認する。

(3) SOX2 過剰発現細胞株における AKT 経路阻害剤の効果を調べる。すなわち AKT 経路の阻害による PI3K/AKT/mTOR 経路抑制の確認と、それに伴う SOX2 過剰発現細胞の増殖抑制効果を検証する。

SOX2 の遺伝子増幅のある肺扁平上皮癌細胞株に対して AKT 阻害剤を投与し濃度依存性に pAKT および mTORC1 経路の指標である pS6 の発現が抑制され、細胞増殖が抑制されるかを確認する。

(4) SOX2 が PI3K/AKT/mTOR 経路を亢進させる機序を明らかにするため、PI3K/AKT/mTOR 経路の negative regulator である PTEN の発現の変動を調べる。

SOX2 遺伝子増幅を有する細胞株において、SOX2 のノックダウンを行い PTEN の発現を確認する。

SOX2 のノックダウンに加え PTEN のノックダウンを行い、pAKT 発現を確認。

SOX2 をノックダウンした際の PTEN の mRNA レベルを確認し SOX2 による PTEN の転写レベルの制御の可能性を確認する。

食道癌において SOX2 は miRNA の発現制御を介して PTEN を抑制するとの報告もあり、これを確認する。

が確認されれば SOX2 によって制御される miRNA を探索するため、SOX2 の遺伝子増幅を有する細胞株に対して siRNA を用いて SOX2 をノックダウンした後、発現が変動する miRNA を探索する。

で探索した miRNA が PTEN を抑制し、pAKT を亢進するか確認する。また、miRNA の inhibitor を導入すると PTEN が回復するか確認する。

さらに SOX2 をノックダウンした後で miRNA を導入すると PTEN が低下するか確認する。SOX2 の低発現株に対し SOX2 を導入することでで探索した miRNA の発現上昇を認めるか、更に PTEN の抑制、pAKT の亢進を認めるか確認する。

(5) SOX2 の発現を抑制することで、肺扁平上皮癌の浸潤能獲得を阻害する因子である SOX9 に対する作用を確認する。

4. 研究成果

(1) 金沢医科大学で 2006 年から 2016 年の期間に手術を行い原発性肺扁平上皮癌と診断された 100 例を選別し、性別、喫煙歴、病理病期、リンパ管浸潤(Ly)、脈管浸潤(V)、分化度(G)など臨床病理学的因子の検討した(表)。免疫組織学的手法を用いて SOX2, SOX9, PTEN, PIK3CA 蛋白発現の有無と臨床病理学的解析を行う予定であった。本研究に関連する蛋白発現を確認するために免疫染色を試みたが、条件の設定が定まらなかった。

(2) SOX2 が遺伝子増幅している肺扁平上皮癌細胞株において RNAi 法を用いて SOX2 を抑制した時に変動するシグナル経路のスクリーニングのため、リン酸化蛋白アレイ(抗体アレイ)を行う。得られた結果は、ウエスタンブロッティング法を用いて検証する予定だったが、臨床が忙しく研究に時間を割くことができなかった。従って細胞株を用いた実験は進まなかった。

性別	女/男	6/94
喫煙歴	なし/あり/不明	3/96/1
病理病期	A/ B/ A/ B/ A	30/28/16/14/12
分化度	G1/G2/G3/不明	14/59/25/2
胸膜浸潤	p10/p11/p12/p13	69/15/6/10
リンパ管浸潤	ly0/ly1/不明	50/43/7
脈管浸潤	V0/V1/V2/不明	28/64/1/7

(表)金沢医科大学・肺扁平上皮癌症例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浦本 秀隆 (URAMOTO Hidetaka)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究協力者	本野 望 (MOTONO Nozomu)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	
研究協力者	山田 壮亮 (YAMADA Sohsuke)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究協力者	上田 善道 (UEDA Yoshimiti)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関